

Propagación *in vitro* de guayaba (*Psidium guajava* L.) a partir de segmentos nodales*

In vitro propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from nodal segments

Lucila Perales Aguilar¹, Héctor Silos Espino², Luis Lorenzo Valera Montero², Catarino Perales Segovia^{2§} y Silvia Flores Benítez²

¹Maestría en Ciencias en Biotecnología Agropecuaria-ITEL. (lilyx_one@hotmail.com). ²Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes, km 18 de la carretera Aguascalientes-San Luis Potosí, Aguascalientes, México. (silosespino@hotmail.com; lvalera2003@gmail.com; sbenitez@gmail.com). [§]Autor para correspondencia. cperales55@hotmail.com.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue desarrollar y proponer un protocolo para propagar *in vitro* el guayabo a partir de segmentos nodales de árboles en producción. El material vegetativo de campo se colectó de junio de 2012 a junio de 2013. Para la asepsia y medio de cultivo inicial de los explantes, se realizaron tres experimentos, en el primero se evaluaron cuatro fungicidas, dos sistémicos: Benomyl y Carbendazim, uno de contacto, oxícloruro de cobre y uno natural, fractal, en diferentes concentraciones y combinaciones. En el segundo se probaron diferentes antioxidantes y desinfectantes como: PVP, cloro, etanol, tween, ácido cítrico y ácido ascórbico. En el tercero, para el medio inicial, se evaluó MS suplementado con diferentes combinaciones de PVP, ácido cítrico, ácido ascórbico, nitrato de plata y carbón activado. Para la multiplicación *in vitro* se evaluaron dos segmentos nodales con diferentes combinaciones de dos reguladores del crecimiento: IBA y BAP. Además se identificaron los principales microorganismos contaminantes del medio. De acuerdo con los resultados obtenidos, el mejor tratamiento con fungicidas fue la combinación de: Benomyl 2 g L⁻¹, Carbendazim 2 g L⁻¹ y oxícloruro de cobre 1 g L⁻¹. El mejor tratamiento de antioxidantes y desinfectantes fue PVP 0.5%, cloro 5% y 3 gotas de tween 20. Aunque no hubo diferencias estadísticas, el mejor medio de cultivo inicial fue: MS + PVP

Abstract

The aim of this work was to develop and propose a protocol to propagate guava *in vitro* from nodal segments of trees in production. The plant material was collected field June 2012 to June 2013. For the cleanliness and initial culture medium of explants, three experiments were performed in the first four fungicides, two systemic evaluated: Benomyl and Carbendazim, one of contact, copper oxychloride and one natural, fractal, in different concentrations and combinations. PVP, chlorine, ethanol, tween, citric acid and ascorbic acid: In the second and different antioxidants were tested as disinfectants. In the third to the initial medium we were evaluated MS supplemented with different combinations of PVP, citric acid, ascorbic acid, silver nitrate and activated carbon. For *in vitro* multiplication two nodal segments with different combinations of two growth regulators were evaluated: IBA and BAP. Besides the main environmental contaminating microorganisms were identified. According to the results, the best fungicide treatment was a combination of: Benomyl 2 g L⁻¹, Carbendazim 2 g L⁻¹ and 1 g copper oxychloride L⁻¹. The best treatment of antioxidants and disinfectants was PVP 0.5%, chlorine 5% and 3 drops of tween 20. Although there were no statistical differences, the best initial culture medium was: MS + PVP 0.75 g L⁻¹ and activated carbon 2 g L⁻¹. For *in vitro* multiplication,

* Recibido: noviembre de 2015
Aceptado: marzo de 2016

0.75 g L⁻¹ y carbón activado 2 g L⁻¹. Para multiplicación *in vitro*, el mejor tratamiento fue: segmento nodal uno en MS + 0.5 mg L⁻¹ BAP + 0.1 mg L⁻¹ IBA, con brotes de 1.48 cm y tres hojas por brote. Se identificaron dos hongos contaminantes del medio de cultivo: *Aspergillus* sp. y *Alternaria* sp. A partir de los resultados obtenidos, se propone un protocolo completo para la multiplicación *in vitro* del guayabo, a partir de segmentos nodales de árboles en producción.

Palabras clave: *Psidium guajava* L., contaminación, propagación *in vitro*, oxidación, regeneración, segmento nodal.

Introducción

Desde hace muchos años el guayabo se cultiva comercialmente y es una especie que se distribuye en los trópicos y subtrópicos de más de 50 países en el mundo. Los principales países donde se cultiva guayaba son: India, China, Tailandia, Paquistán, México, Filipinas, Egipto y Estados Unidos de América. En México, Michoacán y Aguascalientes son los principales estados productores de guayaba con calidad de exportación (SAGARPA, 2012). El material genético de guayaba en Calvillo, Aguascalientes, es de origen criollo, seleccionado por los productores, conocido como "China y Media china". La variabilidad observada en los frutos de guayaba es amplia, en cuanto forma, tamaño de fruto, color de pulpa, espesor de casco, número de semillas por fruto (Padilla *et al.*, 2007).

Las huertas en Calvillo, Aguascalientes, fueron establecidas inicialmente por semilla, el principal problema que se observa en la guayaba propagada por esta vía es que no garantiza la calidad del producto que se va a cosechar, por la variabilidad de la progenie (Mendoza *et al.*, 2004). Las huertas presentan una alta variabilidad genética, lo que dificulta satisfacer las exigencias de uniformidad y calidad de la fruta para el mercado exterior. El control de plagas y enfermedades es deficiente, lo que repercute negativamente en el desarrollo del árbol (SAGARPA, Anexo B, 2011).

Mediante la propagación asexual se asegura que las plantas que se obtengan, presenten las mismas características de las plantas originales. En guayaba se utiliza el injerto, estacas, hijuelos de raíz y el acodo aéreo, siendo éste último el que más se practica. El problema con el acodo aéreo es que se necesita mucho material vegetativo para la propagación masiva (García, 2009). Otro tipo de propagación asexual es la

the best treatment was: one nodal segment MS + 0.5 mg L⁻¹ BAP + 0.1 mg L⁻¹ IBA, with outbreaks of 1.48 cm and three leaves per shoot. *Aspergillus* sp., and *Alternaria* sp. two fungal contaminants of the culture medium were identified. From the results obtained, a complete protocol for *in vitro* multiplication guava, from nodal segments trees in production is proposed.

Keywords: *Psidium guajava* L., *in vitro* propagation, nodal segment, oxidation, pollution, regeneration.

Introduction

For many years the guava is grown commercially and is a species found in the tropics and subtropics over 50 countries worldwide. The main countries where guava is grown are India, China, Thailand, Pakistan, Mexico, the Philippines, Egypt and the United States. In Mexico, Michoacan and Aguascalientes are the major producing states guava export quality (SAGARPA, 2012). The genetic material of guava in Calvillo, Aguascalientes, is of Creole origin, selected by the producers, known as "China and Chinese Media". The variability observed in the guava fruit is large, as a form, fruit size, flesh color, thickness of hull, number of seeds per fruit (Padilla *et al.*, 2007).

Orchards in Calvillo, Aguascalientes, were initially established by seed, the main problem observed in guava spread in this way is that it guarantees the quality of the product to be harvested by the variability of the offspring (Mendoza *et al.*, 2004). The gardens have a high genetic variability, making it difficult to meet the requirements of uniformity and quality of the fruit for the export market. Control of pests and diseases is poor, which adversely affects the development of the tree (SAGARPA, Annex B, 2011).

By asexual propagation it ensures that plants are obtained, with the same characteristics of the original plants. In guava grafting, cuttings, root suckers and air layering is used, the latter being the most widely practiced. The problem with air layering is much plant material for mass propagation (García, 2009) is needed. Another type of asexual propagation is the *in vitro* propagation, which is the multiplication of a species from a tissue or organ under aseptic conditions, this ensures that the regenerated plants are clones of the mother plant (Perales *et al.*, 2005).

propagación *in vitro*, que es la multiplicación de una especie a partir de un tejido u órgano bajo condiciones de asepsia, esta garantiza que las plantas regeneradas sean clones de la planta madre (Perales *et al.*, 2005).

Se han llevado a cabo diversos estudios de micropropagación de guayabo basados en organogénesis directa o indirecta que fueron desarrollados a partir de explantes de meristemos y hojas jóvenes. Los resultados obtenidos de estos estudios mostraron altos índices de contaminación, oxidación y dependencia entre el genotipo y la respuesta organogenética, sin llegar a poder establecer *in vitro* el guayabo (Portal *et al.*, 2003).

Para el establecimiento, multiplicación y enraizamiento de plantas leñosas como el guayabo se emplean diversos medios de cultivo, donde se puede destacar el medio Murashige y Skoog (MS) (1962). Es en esta etapa donde se realiza verdaderamente la micropropagación, obteniéndose un gran número de nuevos brotes a partir de cantidades mínimas de tejido (Pérez *et al.*, 1999).

Las auxinas estimulan la elongación celular, las más utilizadas en cultivo *in vitro* son: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftaleno acético (ANA), ácido indol acético (AIA) y el ácido indol 3 butírico (IBA). Las citocininas promueven la división celular en tejidos no meristemáticos y una de las más usadas es la Bencilaminopurina (BAP) (Trigiano y Gray, 2000). La etapa de regeneración *in vitro* no podría llevarse a cabo sin la adición de reguladores de crecimiento al medio de cultivo. Las auxinas estimulan la elongación celular y las citocininas promueven la división celular en tejidos no meristemáticos (Gutiérrez *et al.* 1998). Pallavi y Praves, (2012), obtuvieron un 80% de brotación con la aplicación de 3 mg L⁻¹ de BAP y 0.1 mg L⁻¹ de ANA. Los mejores resultados de regeneración *in vitro* fueron con 1 mg L⁻¹ BAP y 160 mg L⁻¹ adenina que obtuvieron hasta 3.2 brotes por explante. Roshan *et al.* (2007) en su investigación acerca de la regeneración *in vitro* del guayabo, establecieron explantes en medio de cultivo MS y obtuvieron mayor número de plántulas enraizadas con 2.5 mg L⁻¹ IBA y 2.5 mg L⁻¹ IAA. Tariq *et al.* (2008) en su trabajo sobre regeneración *in vitro* de guayaba utilizaron para enraizar la combinación de 1.5 mg L⁻¹ IBA y 0.5 mg L⁻¹ ANA, obteniendo hasta 85% de plántulas enraizadas.

Otros problemas importantes en la micropropagación del guayabo son la oxidación de los tejidos y la contaminación. Los antioxidantes más empleados en la propagación *in vitro* del guayabo son L-cisteína, polivinilpirrolidona (PVP), ácido ascórbico y ácido cítrico, existe una estrecha relación

They have conducted several studies based guava micropropagation directly or indirectly organogenesis which were developed from explants meristem and young leaves. The results of these studies showed high levels of contamination, oxidation and dependence between genotype and organogenética answer, without being able to establish *in vitro* guava (Portal *et al.*, 2003). For the establishment, multiplication and rooting of woody plants such as guava various culture media, where you can highlight the Murashige and Skoog (MS) (1962) they are used. It is at this stage that truly makes micropropagation, obtained a large number of new shoots from small amounts of tissue (Perez *et al.*, 1999).

Auxins stimulate cell elongation, the most commonly used in *in vitro* culture are: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), naphthalene acetic acid (ANA), indole acetic acid (AIA) and indole butyric acid, 3 (IBA). Cytokinins promote cell division in meristematic tissues and not one of the most used is the benzylaminopurine (BAP) (Trigiano and Gray, 2000). The regeneration step in vitro could not be carried out without the addition of growth regulators in the culture medium. Auxins stimulate cell elongation and cytokinins promote cell division in non meristematic tissues (Gutierrez *et al.*, 1998). Pallavi and Praves (2012), gained 80% of sprouting with the application of 3 mg L⁻¹ BAP and 0.1 mg L⁻¹ of ANA. The best results were *in vitro* regeneration with 1 mg L⁻¹ BAP and 160 mg L⁻¹ adenine obtained up to 3.2 shoots per explant. Roshan *et al.* (2007) in his research on *in vitro* regeneration of guava, established explants in MS medium and obtained greater number of rooted plantlets with 2.5 mg L⁻¹ IBA and 2.5 mg L⁻¹ IAA. Tariq *et al.* (2008) in his work on *in vitro* regeneration of guava used to root the combination of 1.5 mg L⁻¹ IBA and 0.5 mg L⁻¹ ANA, obtaining up to 85% of rooted plantlets.

Other major problems are guava micropropagation tissue oxidation and contamination. More antioxidants used in the *in vitro* propagation of guava are L-cysteine, polyvinylpyrrolidone (PVP), ascorbic acid and citric acid, there is a close relationship between the origin of explant, the concentration of phenols and the success of *in vitro* establishment (Concepción *et al.*, 2005). Tagelsir *et al.* (2006) overcame oxidation explants *in vitro* establishment stage using 1.5% activated carbon, combined with 1 mg L⁻¹ of silver nitrate in supplemented MS medium. The *in vitro* establishment of woody species is largely limited by the dimming of the explants in the medium, caused by pollution.

entre el origen del explante, su concentración de fenoles y el éxito del establecimiento *in vitro* (Concepción *et al.*, 2005). Tagelsir *et al.* (2006) superaron la oxidación de los explantes en la etapa de establecimiento *in vitro* con el uso de carbón activado 1.5%, combinado con 1 mg L⁻¹ de nitrato de plata, suplementado en el medio de cultivo MS. El establecimiento *in vitro* de especies leñosas está en gran medida limitado por el oscurecimiento de los explantes en el medio de cultivo, causado por la contaminación.

Es recomendable el uso de PVP y Carbón activado adicionados al medio de cultivo ya que remueven sustancias tóxicas (Azofeifa, 2009). Algunos autores evitaron la contaminación y la oxidación con explantes provenientes de plantas de semillas propagadas *in vitro*, debido a que las semillas son fáciles de desinfectar para su establecimiento *in vitro* (Tariq *et al.*, 2008, Muhammad *et al.*, 2012). Una alternativa previa a la micropropagación es que las plantas crezcan en condiciones de invernadero, con ello se reducen sustancialmente las tasas de contaminación (Levitus *et al.*, 2010). En propagación *in vitro* de guayaba, los segmentos nodales deben medir hasta de 2 cm para facilitar su desinfección. Para remover compuestos fenólicos es suficiente el uso de 100 mg L⁻¹ de PVP en combinación con 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico.

El objetivo fue desarrollar y evaluar un protocolo óptimo para el establecimiento *in vitro* de la guayaba (*Psidium guajava* L.), mediante segmentos nodales de árboles en producción, para la reproducción masiva de genotipos de interés para los productores.

Material y métodos

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada en el Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes (ITEL), ubicado en el km 18 de la carretera Aguascalientes-San Luis Potosí, el Llano, Aguascalientes, México. Para la manipulación del material vegetativo se utilizaron pinzas y bisturís; la asepsia del material quirúrgico se realizó mediante inmersión en etanol 100% y flameo con mechero (Trigiano y Gray 2000).

Obtención y manejo del material vegetativo

La colecta de explantes de guayaba se realizó cada mes, de junio de 2012 a junio de 2013. Como plantas madre se utilizaron guayabos en etapa de producción de una huerta

It is recommended the use of PVP and activated carbon added to the culture medium and that remove toxic substances (Azofeifa, 2009). Some authors avoided contamination and oxidation with explants from seedlings propagated *in vitro*, because the seeds are easy to disinfect for its establishment *in vitro* (Tariq *et al.*, 2008, Muhammad *et al.*, 2012). An earlier alternative to micropropagation is that plants grow under greenhouse conditions, thereby substantially reducing contamination rates (Levitus *et al.*, 2010). In guava *in vitro* propagation, the nodal segments should measure up to 2 cm for easy disinfection. To remove sufficient phenolics using 100 mg L⁻¹ of PVP in combination with 100 mg l⁻¹ ascorbic acid.

The aim was to develop and evaluate an optimal protocol for the *in vitro* establishment of guava (*Psidium guajava* L.) using nodal segments of trees in production for the mass reproduction of genotypes of interest to producers.

Materials and methods

This research was conducted at the Laboratory of Applied Biotechnology at the Technological Institute Aguascalientes El Llano (ITEL), located at km 18 of the road Aguascalientes-San Luis Potosí, the Llano, Aguascalientes, Mexico. For handling of the plant material used tweezers and scalpels; the cleanliness of the surgical material with 100% and flashover burner was performed by immersion in ethanol (Trigiano and Gray 2000).

Collection and management of plant material

Collecting guava explants was performed each month from June 2012 to June 2013. As a mother guava plants were used in the production stage of an orchard located at 22° 08' 56" north latitude and 102° 25' 20" west longitude, in the Mezquitera, San Tadeo, Calvillo, Aguascalientes.

Asepsis and initial culture medium

In this part of the experimental work they were used explants complete, without dividing them into segments. To have an aseptic accommodation first three treatments with four fungicides, two systemic were evaluated: Benomyl and Carbendazim, one contact, copper oxychloride and one natural, fractal (seed extract citrus) in different concentrations and combinations in a design completely

ubicada a los 22° 08' 56'' latitud norte y 102° 25' 20'' longitud oeste, en La Mezquitera, San Tadeo, Calvillo, Aguascalientes.

Asepsia y medio de cultivo inicial

En esta parte del trabajo experimental se utilizaron explantes completos, sin dividirlos en segmentos. Para tener un establecimiento aséptico, primero se evaluaron tres tratamientos con cuatro fungicidas, dos sistémicos: Benomyl y Carbendazim, uno de contacto, oxícloruro de cobre y uno natural, fractal (extracto de semillas de cítricos) en diferentes concentraciones y combinaciones, en un diseño completamente al azar con tres tratamientos y siete repeticiones, se registró el porcentaje de asepsia, los explantes se mantuvieron en agitación durante dos horas, la unidad experimental fue un frasco de boca ancha de 250 ml, con la solución de cada tratamiento, en el que se introdujeron diez explantes (Cuadro 1).

Para evitar la oxidación y mantener vivos los explantes, propiciando su desarrollo y establecimiento durante el lavado, se evaluaron también cuatro tratamientos con diferentes antioxidantes y desinfectantes como: PVP, cloro, etanol, tween, ácido cítrico y ácido ascórbico en un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos y cuatro repeticiones, la unidad experimental fue un frasco de boca ancha de 250 ml, con la solución de cada tratamiento, en el que se introdujeron diez explantes (Cuadro 2). Se registró el porcentaje de sobrevivencia.

Los explantes fueron colocados en una solución que contenía agua destilada estéril con los antioxidantes y desinfectantes; dependiendo de cada tratamiento, para evitar la oxidación durante el traslado al laboratorio.

Para definir el medio de cultivo inicial para el establecimiento *in vitro* del guayabo, se evaluaron cuatro tratamientos con siete repeticiones (Cuadro 3), utilizando un diseño completamente al azar, donde la unidad experimental fue un frasco "Gerber" con cinco explantes. En este experimento no se incluyó un testigo, porque sin el uso de fungicidas se contaminan todos los explantes debido a que provienen de campo.

El medio de cultivo MS se suplementó con 1 mg L⁻¹ de Benomyl y 0.50 g L⁻¹ del antibiótico Cefotaxima para mantener a los explantes sin contaminar, lo cuales se retiraron del medio en un lapso de 15 días, disminuyendo

randomized with three treatments and seven replicates, the percentage aseptic recorded, the explants were kept under stirring for two hours, the experimental unit was a wide mouth jar of 250 ml, with each treating solution, wherein ten explants were introduced (Table 1).

Cuadro 1. Tratamientos con fungicidas para el establecimiento *in vitro* de los explantes de guayabo.

Table 1. Treatments with fungicides for *in vitro* establishment of explants guava.

Tratamiento	Descripción
1	Benomyl 2 g L ⁻¹ , carbendazim 2 g L ⁻¹ y oxícloruro de cobre 1 g L ⁻¹
2	Benomyl 2 g L ⁻¹ y fractal 12 ml L ⁻¹
3	Benomyl 1 g L ⁻¹ , oxícloruro de cobre 1 g L ⁻¹ y fractal 12 ml L ⁻¹

To prevent rust and keep alive the explants, promoting their development and establishment during washing, four treatments with different disinfectants such as antioxidants: PVP, chlorine, ethanol, tween, citric acid and ascorbic acid in a completely randomized design and also evaluated with four treatments and four replications, the experimental unit was a wide mouth jar 250 ml, the solution of each treatment, in which ten explants were introduced (Table 2). the survival rate was recorded.

Cuadro 2. Tratamientos con antioxidantes y desinfectantes en la solución de lavado de los explantes.

Table 2. Treatment with antioxidants and disinfectants in the wash solution explants.

Tratamiento	Descripción
1	PVP 0.5 g L ⁻¹ , cloro 5% y etanol 70%
2	Ácido cítrico 0.2%, ácido ascórbico 0.6% y cloro 15%
3	PVP 0.5%, cloro 5% y 3 gotas de tween 20
4	Ácido ascórbico 0.15 g L ⁻¹ , ácido cítrico 0.2 g L ⁻¹ y cloro 5%

The explants were placed in a solution containing sterile distilled water with antioxidants and disinfectants; depending on the treatment to prevent oxidation during transfer to the laboratory.

To define the initial culture medium for the *in vitro* establishment of guava, four treatments with seven replicates (Table 3) were evaluated using a completely randomized design, where the experimental unit was a bottle "Gerber"

gradualmente la concentración. Cefotaxima es reportado como un antibiótico que no daña a los cultivos vegetales (Licea-Moreno *et al.*, 2007).

Cuadro 3. Tratamientos evaluados para definir el medio de cultivo inicial.

Table 3. Treatments evaluated to define the initial culture medium.

Tratamiento	Descripción
1	MS+PVP 0.75 g L ⁻¹ y carbón activado 2 g L ⁻¹
2	MS + ácido cítrico 0.1 g L ⁻¹ + ácido ascórbico 0.1 g L ⁻¹ y carbón activado 2 g L ⁻¹
3	MS + nitrato de plata 1 x 10 ⁻³ g L ⁻¹ y carbón activado 1.5%

Multiplicación *in vitro*

Para esta parte del estudio se dividieron los explantes en segmentos nodales uno y dos, cada uno de 0.5 cm de largo, los cuales fueron colocados en medio MS suplementado con 30 g L⁻¹ azúcar y 7.5 g L⁻¹ agar. Para la inducción de brotes se evaluaron seis tratamientos (Cuadro 4), de los cuales cuatro fueron adicionados con reguladores de crecimiento y los últimos dos tratamientos fueron testigos sin reguladores de crecimiento, utilizándose un diseño completamente al azar con seis tratamientos y siete repeticiones, tomando como unidad experimental un frasco Gerber con un explante. Las variables evaluadas fueron longitud de brotes y número de hojas por brote y se registraron a los 40 días. Las condiciones ambientales del cuarto de incubación fueron una temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad y una intensidad lumínica de 2000 lux. Para procesar los datos de todos los experimentos se utilizó el paquete estadístico SAS versión 8, en donde se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y las pruebas de comparación de medias (Duncan 5%).

Los brotes regenerados *in vitro* fueron enraizados con 1 mg L⁻¹ IBA, tratamiento ya probado durante varios años en experimentos realizados en nuestro Instituto. La aclimatación de las plantas se realizó de manera gradual con el uso del Fractal, fungicida/bactericida de origen natural y no se presentaron problemas de contaminación.

Identificación de microorganismos contaminantes del medio de cultivo

Se tomaron muestras de colonias o crecimientos de microorganismos de los medios de cultivo contaminados, se aislaron y se cultivaron en medio de cultivo papa dextrosa

with five explants. In this experiment a control was included, because without the use of fungicides all contaminated explants because they come field.

The MS medium was supplemented with 1 mg L⁻¹ of Benomyl and 0.50 g L⁻¹ of the antibiotic cefotaxime to keep uncontaminated explants, which it withdrew from the average over a period of 15 days, gradually decreasing concentration. Cefotaxime is reported as an antibiotic that does not harm vegetable crops (Licea-Moreno *et al.*, 2007).

In vitro multiplication

For this part of the study the explants were divided into nodal segments one and two, each 0.5 cm long, which were placed in MS medium supplemented with 30 g L⁻¹ sugar and 7.5 g L⁻¹ agar. For shoot induction six treatments (Table 4), of which four were added with growth regulators and the last two treatments were evaluated witnessed no growth regulators fully used a randomized design with six treatments and seven replicates, taking Gerber experimental unit one vial of explant. The variables evaluated were shoot length and number of leaves per shoot and recorded at 40 days. The environmental conditions were incubation room at 25 ± 2 °C, photoperiod 16 h light and 8 h dark and a luminous intensity of 2 000 lux. To process data from all experiments the statistical package SAS version 8 was used, where the analysis of variance (ANOVA) and mean comparison test (Duncan 5%) was performed.

Cuadro 4. Tratamientos evaluados para la multiplicación *in vitro* del guayabo.

Table 4. Treatments evaluated for *in vitro* multiplication of guava.

Tratamiento	Descripción
1	Segmento nodal uno y 1 mg L ⁻¹ BAP
2	Segmento nodal dos y 1 mg L ⁻¹ BAP
3	Segmento nodal uno y 0.5 mg L ⁻¹ BAP + 0.1 mg L ⁻¹ IBA
4	Segmento nodal dos y 0.5 mg L ⁻¹ BAP + 0.1 mg L ⁻¹ IBA
5	Segmento nodal uno, testigo
6	Segmento nodal dos, testigo

Regenerated shoots were rooted *in vitro* with 1 mg L⁻¹ IBA, treatment and tested for several years in experiments carried out in our Institute. Acclimatization of plants was carried out gradually with the Fractal he used fungicide/bactericide natural and no pollution problems arose.

agar (PDA). Una vez desarrolladas las colonias, se realizó la identificación de los microorganismos contaminantes con base en claves, fotografías y con el microscopio compuesto.

Resultados y discusión

Asepsia y medio de cultivo inicial

Es importante resaltar que se trabajó con explantes obtenidos de árboles en producción y de acuerdo con las colectas realizadas durante todo un año y a diferentes horas del día, se concluye que la mejor época para obtener material vegetativo de plantas de guayaba en campo, es de abril a junio lo más temprano posible. Lo cual coincide con lo reportado por Amin y Jaiswal's (1987) quienes encontraron menor contaminación de los explantes en los meses de abril a junio.

De acuerdo con los resultados obtenidos con los fungicidas, el tratamiento uno, Benomyl 2 g L⁻¹, Carbendazim 2 g L⁻¹ y oxiclورو de cobre 1 g L⁻¹ presentó el mayor porcentaje de desinfección, un 60%, de acuerdo con la prueba de comparación de medias (Cuadro 5). De acuerdo con la literatura revisada, los mejores resultados se obtienen con una mayor la concentración de los fungicidas sistémicos y menor del de contacto, con mayor razón al trabajar con material vegetativo de campo, por ejemplo, Ramírez *et al.* (2000) utilizaron una concentración más alta del fungicida sistémico para una mayor penetración en el tejido. Aunque al utilizar solo fungicidas sistémicos los resultados no son satisfactorios, como lo mencionan Flores-Mora *et al.* (2009) quienes utilizaron hasta 6 g L⁻¹ de benomyl en el establecimiento *in vitro*, y solo obtuvieron un 31.67% de explantes limpios. El efecto de la posición de segmentos nodales de guayaba también es importante, como lo reportan Shekafandeh y Khosh-khui (2008), que usaron Benomyl 4 g L⁻¹ durante el periodo de 30 a 45 min en combinación con Hg₂Cl 0.2 g L⁻¹ por 2 min y superaron la parte de asepsia.

Los mejores resultados obtenidos con los antioxidantes y desinfectantes, se presentaron con el tratamiento tres, PVP 0.5%, cloro 5% y 3 gotas de tween 20 (Cuadro 6). Los explantes se mantuvieron sin oxidar hasta por 24 h. El tratamiento uno obtuvo solo 10% de sobrevivencia posiblemente debido al etanol 70%, que en otros tejidos presenta buenos resultados, pero no en especies leñosas como el guayabo.

Identifying contaminating microorganisms from the culture medium

Were taken samples growth of colonies or microorganisms contaminated culture media, were isolated and cultured in potato dextrose agar culture medium (PDA). After colonies developed, identifying contaminating microorganisms based on keys, photographs and the compound microscope was performed.

Results and discussion

Asepsis and initial culture medium

Importantly worked with explants obtained from trees in production and in accordance with the collections made for a year and at different times of the day, it is concluded that the best time for planting material of plants guava field is April June as early as possible. Which coincides with that reported by Amin and Jaiswal's (1987) who found less contamination of the explants in the months april to june.

According to the results obtained with fungicides, treatment one Benomyl 2 g L⁻¹, Carbendazim 2 g L⁻¹ and 1 g copper oxychloride L⁻¹ had the highest percentage of disinfection, 60%, according to test comparison of means (Table 5). According to the literature reviewed, the best results are obtained with a greater concentration of systemic and contact fungicides smaller, more so when working with plant material field, for example, Ramírez *et al.* (2000) used a higher concentration of systemic fungicide greater tissue penetration. Although using systemic fungicides only the results are not satisfactory, as reported Flores-Mora *et al.* (2009) who used up to 6 g L⁻¹ benomyl in establishing in vitro, and only 31.67% got a clean explants. The effect of the position of nodal segments of guava is also important, as reported Shekafandeh and Khosh-Khui (2008), who used Benomyl 4 g L⁻¹ during the 30-45 min in combination with Hg₂Cl 0.2 g L⁻¹ 2 min and passed the aseptic part.

The best results obtained with anti-oxidants and disinfectants, were presented with three treatment, 0.5% PVP, chlorine 5% and 3 drops of Tween 20 (Table 6). Explants were kept without oxidizing up to 24 h. Treatment one received only a 10% survival possibly due to ethanol 70%, than in other tissues shows good results, but not in woody species such as guava.

Cuadro 5. Respuesta al tratamiento con fungicidas en la asepsia de los explantes de guayaba.**Table 5. Response to treatment with fungicides in aseptic explants guava.**

Tratamiento	Medias (% de asepsia)
1. Benomyl 2 g L ⁻¹ , carbendazim 2 g L ⁻¹ y oxícloruro de cobre 1 g L ⁻¹	60.0 b
2. Benomyl 2 g L ⁻¹ y fractal 12 ml L ⁻¹	42.9 b
3. Benomyl 1 g L ⁻¹ , oxícloruro de cobre 1 g L ⁻¹ y Fractal 12 ml L ⁻¹	8.6 a

*Medias con la misma literal son estadísticamente iguales (Duncan, $p \leq 0.05$).

El mejor tratamiento obtuvo 90% de sobrevivencia de los explantes; similar a lo reportado por Ocampo y Núñez (2007), quienes probaron como desinfectante, cloro al 5% con 3 gotas de Tween en agitación durante 10 min y bicloruro de mercurio al 0.05%, durante 2 min, los dos tratamientos presentaron buenos resultados, pero optaron por el primero, debido a que es de fácil manejo y no es tóxico; es importante señalar, que trabajaron con plantas jóvenes en invernadero. Liu y Yang (2011) en su trabajo de propagación *in vitro* de guayaba a partir de segmentos nodales de árboles maduros, lavaron los explantes para evitar la oxidación con PVP 0.5% durante 40 min, suplementaron el medio de cultivo MS con 250 mg L⁻¹ de PVP y obtuvieron un 53.3% de sobrevivencia, menor a lo obtenido en este estudio.

Los tres tratamientos para evaluación del medio de cultivo inicial mostraron buenos resultados, manteniendo a los explantes libres de oxidación y contaminación. Se eligió el tratamiento uno con PVP 0.75 g L⁻¹ y Carbón activado 2 g L⁻¹, debido a que fue el tratamiento modificado por los autores de este trabajo y que numéricamente obtuvo los mejores resultados (Cuadro 7).

Cuadro 7. Resultados de los tratamientos evaluados para el medio de cultivo inicial.**Table 7. Results of the treatments evaluated for the initial culture medium.**

Tratamiento	Descripción	Medias (% de sobrevivencia)	Referencia
1	PVP 0.75 g L ⁻¹ y carbón activado 2 g L ⁻¹	94.82 a	Modificado (2013).
2	Ácido cítrico 0.1 g L ⁻¹ , ácido ascórbico 0.1 g L ⁻¹ y carbón activado 2 g L ⁻¹	94.82 a	Shekafandeh y Khosh Khui (2008).
3	Nitrato de plata 1 x 10 ⁻³ g L ⁻¹ y Carbón activado 1.5%	85.71 a	Tagelsir <i>et al.</i> (2006).

*Medias con la misma literal son estadísticamente iguales (Duncan, $p \leq 0.05$).**Cuadro 6. Efectos agentes antioxidantes en la solución de lavado de los explantes.****Table 6. Effects antioxidant agents in the wash solution explants.**

Tratamiento	Medias (% de sobrevivencia)
1. PVP 0.5 g L ⁻¹ , cloro 5% y etanol 70%	10.0 a
2. Ácido cítrico 0.2%, ácido ascórbico 0.6% y cloro 15%	30.0 ab
3. PVP 0.5%, cloro 5% y 3 gotas de tween 20	90.0 c
4. Ácido ascórbico 0.15 g L ⁻¹ , ácido cítrico 0.2 g L ⁻¹ y cloro 5%	50.0 b

*Medias con la misma literal son estadísticamente iguales (Duncan, $p \leq 0.05$).

The best treatment obtained 90% survival of the explants; similar to those reported by Ocampo and Nunez (2007), who tested as a disinfectant, chlorine 5% with 3 drops of Tween stir for 10 min and mercury dichloride 0.05% for 2 min, the two treatments had good results, but they chose the former, because it is easy to use and is non-toxic; Importantly, it is working with young plants in a greenhouse. Liu and Yang (2011) in their work of *in vitro* propagation of guava from nodal segments of mature trees, washed explants to prevent oxidation with 0.5% PVP for 40 min, the supplemented MS medium with 250 mg L⁻¹ PVP and achieved a 53.3% survival, lower than that obtained in this study.

The three treatments for evaluation of initial culture medium showed good results, keeping oxidation and contamination free explants. chose one treatment with PVP 0.75 g L⁻¹ Activated charcoal 2 g L⁻¹, because the treatment was modified by the authors of this paper and numerically obtained the best results (Table 7).

Los tres tratamientos evaluados para la elección del medio de cultivo inicial, presentaron buenos resultados por los altos porcentajes de sobrevivencia de 85.71 a 94.82%, aunque no hubo diferencias estadísticas significativas, de acuerdo con el análisis de varianza. Saelew y Yang (2009) obtuvieron resultados diferentes en su estudio sobre la propagación *in vitro* de *Psidium guajava* L. con el uso de ápices en medio MS y para evitar la oxidación suplementaron el medio de cultivo con ácido ascórbico 100 mg L⁻¹ y ácido cítrico 150 mg L⁻¹, la mayor brotación, 78.8%, la tuvieron con 2 mg L⁻¹ BAP y 0.1 mg L⁻¹ de IBA.

Multiplicación *in vitro*

De acuerdo con los resultados obtenidos en la regeneración *in vitro* a partir de los segmentos nodales de guayaba los tratamientos con reguladores del crecimiento fueron iguales, solo los dos testigos presentaron diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 9).

El tratamiento tres obtuvo brotes de 1.4 cm de longitud y tres hojas por brote. Kumar *et al.* (2009) en su trabajo sobre regeneración *in vitro* del guayabo, utilizaron segmentos nodales que establecieron en medio MS, la mayor brotación fue con 1 mg L⁻¹ de BAP y desarrollaron 2.45 brotes por explante y el tratamiento óptimo para inducir raíz fue 1 mg L⁻¹ de IBA. Ali *et al.* (2003) en su trabajo sobre micropropagación *in vitro* de guayaba, utilizaron segmentos nodales establecidos en medio MS, obtuvieron hasta 3.72 brotes por explantes con una longitud de hasta 3 cm con 2 mg L⁻¹ BAP, reportaron haber tenido mejores resultados en la formación de raíces al utilizar 1 mg L⁻¹ de IBA, con raíces de hasta 5.4 cm de longitud. Tagelsir *et al.* (2006) reportaron el tratamiento de 1 mg L⁻¹ IBA como el más efectivo para el enraizamiento de *Psidium guajava* L. Muhammad *et al.* (2012) después de superar la etapa de multiplicación *in vitro* e inducir la formación de raíces de las plántulas, las aclimataron gradualmente al colocarlas en macetas con composta.

El protocolo completo estandarizado, obtenido de este estudio, para el establecimiento *in vitro* de guayaba mediante segmentos nodales se muestra en el Cuadro 10.

Identificación de microorganismos contaminantes del medio de cultivo

Se identificaron dos tipos de hongos: *Aspergillus* sp. y *Alternaria* sp. En *Aspergillus*, los conidios constituyen cadenas que se originan en la célula conidiógena o fiálide. En *Aspergillus* se observaron células adyacentes a las fiálides

The three treatments evaluated for choosing the initial culture medium, showed good results by the high percentage of survival of 85.71 to 94.82%, although there were no statistically significant differences, according to the analysis of variance. Saelew and Yang (2009) obtained different results in their study on the *in vitro* propagation of *Psidium guajava* L. using apexes in MS and to prevent oxidation of the culture medium supplemented with ascorbic acid 100 mg L⁻¹ and acid citric 150 mg L⁻¹, most sprouting, 78.8% had it with 2 mg L⁻¹ BAP and 0.1 mg L⁻¹ IBA.

In vitro multiplication

According to the results of the *in vitro* regeneration from nodal segments of guava treatments growth regulators they were equal, only two witnesses had statistically significant differences (Table 9).

Cuadro 9. Resultados de los tratamientos para regeneración *in vitro*.

Table 9. Results of treatments for *in vitro* regeneration.

Tratamiento	Medias (Longitud de brotes en cm)	Medias (Núm. de hojas/brote)
1. Segmento nodal uno, 1 mg L ⁻¹ BAP	1.0429 ab	2.143 ab
2. Segmento nodal dos, 1 mg L ⁻¹ BAP	0.8857 ab	2.857 ab
3. Segmento nodal uno, 0.5 mg L ⁻¹ BAP + 0.1 mg L ⁻¹ IBA	1.4857 a	3.000 a
4. Segmento nodal dos, 0.5 mg L ⁻¹ BAP + 0.1 mg L ⁻¹ IBA	0.9857 ab	2.571 ab
5. Segmento nodal uno, testigo	0.0714 b	0.286 b
6. Segmento nodal dos, testigo	0.100 b	0.286 b

*Medias con la misma literal son estadísticamente iguales (Duncan, $p \leq 0.05$).

The three treatment obtained outbreaks of 1.4 cm in length and three leaves per shoot. Kumar *et al.* (2009) in his work on *in vitro* guava regeneration, used nodal segments established in MS, most sprouting was 1 mg L⁻¹ BAP and developed 2.45 shoots per explant and optimal treatment to induce root was 1 mg L⁻¹ IBA. Ali *et al.* (2003) in his work on *in vitro* micropropagation guava, used nodal segments set in MS, got up 3.72 shoots per explants with a length of 3 cm with 2 mg L⁻¹ BAP, reported having had better results in the formation roots using 1 mg L⁻¹ IBA, with roots to 5.4 cm in length. Tagelsir *et al.* (2006) reported the treatment of 1 mg L⁻¹ IBA as the most

denominadas métulas o células de soporte. El segundo hongo identificado fue *Alternaria* sp. que posee conidióforos primarios largos con conidios en cadenas ramificadas. La ramificación ocurre predominantemente desde el ápice conidial y el conidio primario puede alcanzar hasta dos veces el tamaño del conidio siguiente llevando un corto conidióforo secundario (Barnet y Hunter, 1972). Los resultados concuerdan con los reportados por Acosta *et al.* (2002) quienes en su trabajo sobre la micobiota epifítica y contaminantes fungosos durante el establecimiento *in vitro* de la guayaba (*Psidium guajava* L.) identificaron nueve géneros de hongos filamentosos entre los que destacan *Aspergillus* sp. y *Alternaria* sp., concluyeron que los explantes se pueden establecer *in vitro* mediante el uso de antibióticos, fungicidas y antioxidantes en el medio de cultivo. Los hongos contaminantes en el establecimiento *in vitro* de *Psidium guajava* L. están localizados dentro de la superficie de los segmentos nodales, lo que impide la acción de los desinfectantes superficiales usados. Entre los hongos patógenos identificados en cultivo *in vitro* de guayaba se encuentran *Aspergillus* sp. y *Alternaria* sp. (Ramírez *et al.*, 2000).

effective for rooting *Psidium guajava* L. Muhammad *et al.* (2012) after overcoming the stage of *in vitro* multiplication and induce the formation of root seedlings, gradually acclimated to place them in pots with compost.

The complete standardized protocol obtained in this study for the establishment *in vitro* using nodal segments of guava shown in Table 10.

Identifying contaminating microorganisms from the culture medium

Two kinds of fungi were identified *Aspergillus* sp., and *Alternaria* sp. In *Aspergillus* conidia are chains originating from the conidiogenous cell or phialide. In *Aspergillus* cells adjacent to the phialides called metulae or supporting cells they were observed. The second was identified fungus *Alternaria* sp., having long conidiophores with conidia primary branched chains. Branching occurs predominantly from the apex and primary conidial conidio can reach up to

Cuadro 10. Protocolo estandarizado para la multiplicación *in vitro* del guayabo a partir de segmentos nodales.
Table 10. Standardized protocol for *in vitro* multiplication of guava from nodal segments.

Protocolo
1. Colectar material vegetal (segmentos nodales) por las mañanas, cortando trozos de ramas de 10 a 15 cm con tijeras desinfectadas con alcohol, de preferencia en los meses de abril a junio.
2. Inmediatamente después de colectado el explante, se sumerge en una solución con PVP al 0.5% y Fractal 12 ml L ⁻¹ por 2 h o el tiempo requerido para su traslado al laboratorio.
3. Realizar dos enjuagues con agua de la llave, cepillar y lavar cada explante con Triclosán.
4. Los explantes se sumergen en una solución fungicida Benomyl 2 g L ⁻¹ , Carbendazim 2 g L ⁻¹ y Oxiclورو de cobre 1 g L ⁻¹ más PVP 0.5% por 2 h en agitación.
5. Se cepillan y enjuagan con agua estéril y se colocan en una solución con cloro al 5% y tres gotas de Tween 20 por 10 min en agitación.
6. Dos enjuagues más con agua estéril sumergiendo el material vegetativo en una solución estéril de PVP al 0.5% hasta su traslado a la cámara de flujo laminar.
7. Hacer cortes de los segmentos nodales de 0.5 a 1 cm, en cajas de Petri estériles, sumergiendo los segmentos nodales en PVP 0.5% y se secan en sanitas estériles para su establecimiento.
8. Establecimiento en medio de cultivo inicial de los segmentos nodales en medio MS suplementado con Benomly 1 g L ⁻¹ , carbón activado 2 g L ⁻¹ , PVP 0.75 g L ⁻¹ , 0.50 g L ⁻¹ de Cefotaxima, agar 7.5 g L ⁻¹ y pH de 5.7.
9. Después de 15 días en medio de cultivo inicial, los segmentos nodales se subcultivan al medio para multiplicación.
10. Multiplicación <i>in vitro</i> del segmento nodal uno, en medio MS + 0.5 mg L ⁻¹ BAP + 0.1 mg L ⁻¹ IBA.

Conclusiones

Se desarrolló, se probó y se propone un protocolo para la propagación *in vitro* de guayaba a partir de segmentos nodales obtenidos de árboles en campo (Cuadro 10). En la

twice the size of the next conidio wearing a short secondary conidiophores (Barnet and Hunter, 1972). The results are consistent with those reported by Acosta *et al.* (2002) who in his work on epiphytic and fungal contaminants mycobiota during *in vitro* establishment of guava (*Psidium guajava* L.) identified nine genera of filamentous fungi among which

etapa de asepsia el mejor tratamiento fue la combinación de los fungicidas Benomyl 2 g L⁻¹, Carbendazim 2 g L⁻¹ y oxiclورو de cobre 1 g L⁻¹. La oxidación del material vegetal se superó, al colectar los explantes lo más temprano posible, en los meses de abril a junio y utilizando PVP al 0.5% con cloro 5% y 3 gotas de tween 20; logrando así su establecimiento aséptico. En la evaluación del medio de cultivo inicial no hubo diferencias estadísticas, pero se eligió el tratamiento uno, PVP 0.75 g L⁻¹ y Carbón activado 2 g L⁻¹. En la etapa de multiplicación todos los tratamientos con reguladores del crecimiento fueron estadísticamente iguales. Se realizó la identificación microscópica de los dos hongos contaminantes durante la propagación *in vitro* del guayabo, *Aspergillus* sp. y *Alternaria* sp.

Agradecimientos

A CONACYT y al Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes (ITEL). Al gerente del Sistema Producto Guayaba en Aguascalientes, M. C. Jorge Martínez de Lara, M. C. Miguel Ramos Parra e Ing. Juan Carlos Gutiérrez Quezada.

Literatura citada

- Acosta, M.; Caballero, I.; Alvarado, Y. y Leiva, M. 2002. Micobiota epifítica y contaminantes fungosos en el establecimiento *in vitro* de la guayaba (*Psidium guajava* L.). Santa Clara. Villa Clara. Cuba. Bio. veg. 2(2):67-71.
- Amin, M. N. and Jaiswal, V. S. 1987. Rapid clonal propagation of guava through *in vitro* shoot proliferation on nodal explants of mature tress. India. Plant Cell Tissue Org. 8:235-44.
- Ali, R.; Mulwa, M.; Norton, A. and Skirvin, M. 2003. Micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.) Pakistán. Journal of Horticultural Science and biotechnology. 78(5):739-741.
- Azofeifa, Á. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Costa Rica. Agronomía mesoamericana. 20(1):153-175.
- Barnet, H. L. and Hunter, B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Surrge publishing company. United States. 3 edición. United States of America. 241 p.
- Concepción, O.; Nápoles, L.; Pérez, A.; Peralta, N.; Hernández, M. y Trujillo, R. 2005. Efecto de tres antioxidantes en el cultivo *in vitro* de ápices de guayaba (*Psidium guajava* L.) relación entre el origen del explante y el contenido de compuestos fenólicos. La Habana, Cuba. Cultivos tropicales. 26(1):33-39.
- Flores-Mora, D. M.; Jiménez- Bonilla, V. y Chacón-Cerdas, R. 2009. Cultivo de tejidos vegetales en *Ficus carica* con miniestacas. Costa Rica. Agron. Mesoam. 20(2):319-325.
- Aspergillus* sp., and *Alternaria* sp., concluded that explants can be established *in vitro* by using antibiotics, fungicides and antioxidants in the culture medium. Fungal contaminants *in vitro* establishment of *Psidium guajava* L. are located within the area of the nodal segments, which prevents the action of surface disinfectants used. Among the pathogenic fungi *in vitro* culture identified guava are *Aspergillus* sp., and *Alternaria* sp. (Ramirez *et al.*, 2000).

Conclusions

It was developed and tested a protocol for *in vitro* propagation of guava proposed obtained from nodal segments of trees in the field (Table 10). In step aseptic treatment was the best combination of Benomyl 2 g L⁻¹, Carbendazim 2 g L⁻¹ fungicide copper oxychloride and 1 g L⁻¹. Oxidation of plant material is exceeded, the earliest collect explants, in the months of april to june and 0.5% PVP using chlorine 5% and 3 drops of Tween 20; thus ensuring their aseptic facility. In assessing the initial culture medium there were no statistical differences, but the treatment was chosen one PVP 0.75 g L⁻¹ and activated charcoal 2 g L⁻¹. In the multiplication stage all growth regulator treatments were statistically equal. microscopic identification of the two contaminating fungi was performed during propagation in vitro guava, *Aspergillus* sp., and *Alternaria* sp.

End of the English version



- García, M. A. 2009. Guía técnica del cultivo de la guayaba. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal. El Salvador. 32 p.
- Gutiérrez, M. A.; González, H. y Villegas, A. 1998. Biotecnología vegetal I y II. DGETA. Colegio de Posgraduados en Ciencias Agrícolas. México. 160 p.
- Kumar, M.; Shanker, V. and Jaiswal, U. 2009. Shoot multiplication and plant regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) from nodal explants of *in vitro* raised plantlets. India. J. Fruit Orn. Plant Res. 17(1):29-38.
- Licea-Moreno, R.; Pérez, C.; González, A. y Cabrera, E. 2007. Saneamiento de un banco de germoplasma de nogal híbrido. Sociedad española de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. 23-24 pp.
- Liu, X. and Yang, G. 2011. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) on nodal explants of mature elite cultivar. Int. J. Plant Biol. 2(2):11.
- Levitus, G.; Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hopp, E y Mroginski, L. 2010. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Ediciones INTA. Argentina. 647 p.

- Mendoza, M. R.; Aguilar, L. y Castillo, A. 2004. Guayaba (*Psidium guajava* L.) su cultivo en el oriente de Michoacán. SAGARPA. INIFAP. Campo experimental Uruapan. México, D. F. 4:49.
- Muhammad, U.; Madiha, B. and Bilques, F. 2012. Enhanced *in vitro* multiple shoot induction in elite Pakistani guava cultivars for efficient clonal plant multiplication. *Africa. Afr. J. Biotechnol.* 11(44):10182-19187.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. Plant propagation through tissue cultures. United States of America. *Ann. Rev. Plant physiol.* 25:135-166.
- Ocampo, F. y Núñez, V. M. 2007. Propagación *in vitro* de *Psidium guajava* mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales. Colombia. *Revista Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria.* 8(1):22-27.
- Padilla, J. S.; González, E.; Perales, M. A.; Reyes, H. R y Salvador, E. 2007. Variabilidad del fruto de la guayaba (*Psidium guajava* L.) Mexicana. SAGARPA. SNICS. INIFAP. México. D. F. 61 p.
- Pallavi, S. and Praveesh, C. 2012. Efficient regeneration of *Psidium* spp. For *in vitro* screening of wit resistant rootstock. India. *Int. J. Sci. Eng. Res.* 3(3):2229-5518.
- Perales, M. A.; Padilla, J. S.; González, E. y Reyes, H. R. 2005. Manual para la producción integral del cultivo de la guayaba. Consejo Nacional Mexicano de la guayaba, A. C. y Fundación Produce Aguascalientes, A. C. México, D. F. 179 p.
- Pérez, E. M.; Ramírez, R.; Núñez, H. y Ochoa, N. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA). México. 179 p.
- Portal, N.; Caraballos, I.; Alvarado, Y. y Leyva, M. 2003. Bacterias contaminantes en la fase de establecimiento *in vitro* del guayabo. Cuba. *Biocología vegetal.* Santa Clara. Villa Clara. Cuba. 2(2):169-172.
- Ramírez, M. C.; Santos, R. A. e Isea, F. R. 2000. Hongos contaminantes en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Psidium guajava* L. Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (LUZ).* 17:217-225.
- Roshan, Z.; Ali, N.; Shah, S. S. T.; Muhammad, T. and Shah, S. A. 2007. *In vitro* re-generation of guava (*Psidium guajava* L.) from shoot tips of mature trees. *Pakistan. Pak. J. Bot.* 39(7):2395-2395.
- SAGARPA. <http://www.siap.gob.mx/> (consultado enero, 2012).
- SAGARPA. Anexo B. Demandas del sector 2011. 7. Demanda única: guayaba. “validación de las variedades y selecciones existentes en México, manejo fitosanitario y nutrición del guayabo para una producción sustentable en México”. 22 p.
- Saeleew, N. and Yang, Y. S. 2009. Studies on initial shoot tip culture of guava (*Psidium guajava* L.). *Taiwan Horticulture.* 34(3):1-14.
- Shekafandeh, A. and Khosh-khui, M. 2008. Effects of bud position and culture medium on shoot proliferation from nodal culture of two guava cultivars. *Iran. Asian J. Plant Sci.* 7(2):177-182.
- Tagelsir, I.; El-Fatih, M. and Abdelghaffar, E. 2006. Enhancement or growth and control of browning of tissue cultures of guava (*Psidium guajava* L.). *Sudan. J. SC. TECH.* 7(1):1-10.
- Tariq, S.; Zamir, R.; Ahmad, J.; Ali, H. and Lutfullah, G. 2008. *In vitro* regeneration of plantlets from seedlings explants of guava (*Psidium guajava* L.) *Pakistan. CV. Safeda.* 40(3):1195-1200.
- Trigiano, R. and Gray, D. 2000. Plant tissue culture concepts and laboratory exercises. CRC. Washington, D. C. Segunda edición. United States of America. 454 p.